

N° d'enregistrement
au C.N.R.S. : 3808

ARTICLE PRINCIPAL

Recouvrant en partie

LA THESE DE DOCTORAT ES SCIENCES NATURELLES

présentée

A LA FACULTE DES SCIENCES

de PARIS

par

André SENTENAC

pour obtenir

le grade de Docteur Es-Sciences

Sujet de la Thèse : Transcription du DNA par la RNA polymerase in vitro : initiation
des chaînes de RNA.

soutenue le 10.12.1969 devant la Commission d'Examen

MM. F. GROS

Président

J.M. DUBERT

Examineurs

F. CHAPEVILLE

P. FROMAGEOT

Initiation de chaînes de RNA par la RNA polymérase *in vitro*

A. SENTENAC, A. RUET et P. FROMAGEOT

Service de Biochimie, Département de Biologie du Centre d'Etudes Nucléaires de Saclay

(Reçu le 25 janvier/2 mai 1968)

1. In the presence of cordycepin triphosphate (3'-deoxyadenosine triphosphate), an analogue of ATP, RNA polymerase synthesizes very short RNA chains *in vitro*. These chains, labelled on the first nucleotide with [$\gamma^{32}\text{P}$]GTP, are acid soluble but are retained on nitrocellulose filters. After alkaline hydrolysis, chromatography on Dowex 1 (Cl^-) shows that the ^{32}P -labelled molecules behave like guanosine tetraphosphate.

2. When filtered on Sephadex G-75 the oligonucleotides synthesized are associated with a structure of high molecular weight, which is probably the complex DNA-enzyme, and remain so after ribonucleases or deoxyribonuclease treatment.

3. The number of nascent oligonucleotides measured by incorporation of [$\gamma^{32}\text{P}$]GTP, represents only 50% of the chains initiated by guanosine in the control. This observation, together with the fact that nascent oligonucleotides are not sensitive to pancreatic or T_1 ribonuclease, shows that they are involved in a structure which determines their stability. This structure could be an Enzyme-(DNA-RNA hybrid) complex at the growing point of the RNA chains.

4. The kinetics of initiation of RNA are the same whether chain propagation is prevented or not.

5. The number of RNA chains initiated per phage T_7 DNA molecule has been measured with [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP and [$\gamma^{32}\text{P}$]GTP. It increases linearly with the amount of RNA polymerase added although the amount of RNA made tends towards a maximum. On the other hand, the number of nascent oligonucleotides made does not increase with an excess of enzyme, which shows the existence of a finite number of initiation sites. These results are thought to indicate that initiation sites are reutilized during normal RNA synthesis.

6. The number of chains initiated by adenine and guanine per phage T_7 DNA at the point where RNA synthesis, as a function of RNA polymerase concentration, departs from proportionality, is around 50.

Une méthode simple de détection de courtes chaînes de RNA synthétisées *in vitro* par la RNA polymérase DNA dépendante a déjà été décrite [1]. Elle est basée sur le fait établi par Bremer et Konrad [2] que la formation du complexe ternaire DNA-enzyme-RNA est irréversible et sur l'observation [3] que le complexe binaire DNA-enzyme est retenu par les filtres de nitrocellulose. En marquant les chaînes de RNA par leur nucléotide initial selon Maitra *et al.*

[4], on peut dénombrer par filtration directe sur Millipore des chaînes de RNA qui échappent à la précipitation par l'acide trichloroacétique.

Disposant de cette méthode, nous nous sommes proposés d'étudier l'initiation des chaînes de RNA en la dissociant de leur prolongation. Pour prévenir la prolongation des chaînes de RNA, nous avons examiné l'action d'un certain nombre d'inhibiteurs agissant soit au niveau du DNA comme l'actinomycine, la proflavine, la nogalamycine [1] soit directement sur l'enzyme comme le rouge de Congo et le KCl. Aucune de ces substances ne s'est montrée être l'inhibiteur idéal. Ainsi l'actinomycine commence à inhiber l'initiation quand la longueur moyenne des chaînes est encore de plusieurs centaines de nucléotides. Une inhibition beaucoup plus satisfaisante de la prolongation du RNA est obtenue par un analogue de l'ATP, la 3'-désoxyadénosine triphosphate (cordycepin triphosphate). Cet analogue est incapable de former une liaison 3'-5'-phosphodiester et, incorporé à la place de l'ATP, termine toutes les chaînes de RNA [1,5]. Cette méthode a l'avantage de bloquer

Abréviations non usuelles. Cordycepine triphosphate, ou 3'-désoxyadénosine triphosphate, 3'dATP (abrégié CordTP dans un travail antérieur [1]); RNA synthétisé en présence de [$\gamma^{32}\text{P}$]GTP et de 3'dATP, [^{32}P]RNA-3'dAdo; nucléoside triphosphate, NTP; le copolymère formé d'unités désoxyadénylate et thymidylate alternées, poly d(A-T); le polymère constitué d'acide polydésoxyguanylique et polydésoxycytidylique synthétisé avec la DNA polymérase, poly(dG)-poly(dC); 2,5-diphényloxazole, PPO; 1,4-bis-(5-phényloxazolyl-2)-benzène, POPOP.

Enzymes. RNA polymérase ou nucléoside triphosphate: RNA nucléotidyltransférase (EC 2.7.7.6); ribonucléase pancréatique ou ribonucléase pyrimidine-nucléotide-2'-transférase (EC 2.7.7.16); ribonucléase T_1 ou ribonucléate guanine-nucléotide-2'-transférase (EC 2.7.7.26).

la synthèse de RNA sans *a priori* modifier le DNA ou l'enzyme, c'est à dire dans des conditions normales d'initiation des chaînes.

Dans le présent travail on définira comme oligonucléotide naissant tout RNA lié au complexe DNA-enzyme et suffisamment court pour être soluble en milieu acide.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les nucléosides triphosphates tritiés proviennent de Schwarz Bioresarch Inc., les nucléosides triphosphates non marqués de Pabst lab.

Le [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP et le [$\gamma^{32}\text{P}$]GTP ont été préparés par photophosphorylation des nucléosides diphosphates correspondants, comme indiqué précédemment [1]. Leur radioactivité spécifique est de l'ordre de 1.000 à 2.000 coups/min/pmole. La cordycépine provient de Sigma Chemical Company et a été phosphorylée selon les méthodes de Tener [6] et Smith et Khorana [7] par J. L. Darlix.

La cordycépine triphosphate a été isolée et purifiée par chromatographie sur papier Whatmann 3MM dans un solvant acide isobutyrique— NH_4OH — H_2O (7:1:2, v/v) et électrophorèse à pH 4,5 dans un tampon pyridine acide acétique à 1.400 volts pendant 150 min.

Le DNA de phage T_7 a été aimablement offert par J. P. Richardson; le poly d(A-T) et le poly-(dG)-poly(dC) ont été généreusement donnés par E. Reich de l'Institut Rockefeller.

Le DNA de thymus provient du Centre de Recherches macromoléculaires de Strasbourg. Le DNA est dénaturé par chauffage à 100° pendant 10 min et gardé à 0°.

La ribonucléase pancréatique provient de Mann Research Lab., la ribonucléase T_1 est un produit de Sigma Chemical Company. La RNA polymérase a été préparée selon la méthode de Chamberlin et Berg [8]. Les préparations utilisées ont une activité spécifique de 1.000 et 3.000 unités selon la définition donné par ces auteurs.

Les concentrations des divers réactifs pour l'étude de la transcription du DNA sont décrites dans une précédente communication [1] ainsi que dans la légende du Tableau 1.

La réaction est arrêtée par l'addition à 0° de 50 μl d'EDTA 0,5 M à pH 8 et de 1 mg de GTP ou d'ATP entraîneur. En vue de la filtration directe l'échantillon est dilué par 2 ml de tampon froid constitué de Tris 25 mM pH 8, de β -mercaptoéthanol 1 mM, de phosphate 40 mM et de pyrophosphate 25 mM, puis filtré sur membrane Millipore HAWPO25. Le filtre est lavé avec 50 à 70 ml du même tampon, séché sous une lampe infrarouge, et compté par scintillation liquide avec un mélange toluène-POPOP-PPO dans un compteur Nuclear-Chicago. Le compteur est réglé de façon à mesurer le ^3H et le ^{32}P sans contamination réciproque.

Dans la méthode de précipitation en milieu acide, le tampon est remplacé par de l'acide trichloroacétique à 50 g/l contenant du phosphate 40 mM et du pyrophosphate 25 mM.

Filtration sur Sephadex

Le milieu d'incubation (0,5 ml) est placé sur une colonne de Sephadex G-75 (26 $\times$ 1 cm) équilibrée avec un tampon Tris 0,01 M, pH 8, MgCl_2 0,01 M, et élué avec le même tampon avec un débit de 0,5 ml/min. Des fractions de 0,4 à 0,5 ml sont recueillies et comptées dans le liquide scintillant de Bray au compteur Nuclear-Chicago. La récupération de la radioactivité par rapport à la méthode de filtration directe sur Millipore est de 60 à 70% pour le ^3H et de 85 à 100% pour le ^{32}P . On a tenu compte dans ce calcul du fait que l'efficacité de comptage du ^3H sur millipore est divisée par un facteur 1,4.

Analyse du matériel formé en présence de 3'dATP

Le milieu réactionnel est filtré sur Sephadex G-75 et élué avec du KCl 0,05 M ajusté à pH 8. Les fractions collectées (0,4 ml) sont additionnées de 40 μl de KOH 3,3 N et incubées à 37° pendant 18 h. Celles contenant de la radioactivité sont réunies et amenées à un pH voisin de 2 avec de l'acide perchlorique. Le précipité est éliminé. Le surnageant additionné de GTP entraîneur (1 mg) est dilué 10 fois avec de l'eau, et passé sur une colonne de Dowex 1 (X_2 ; 200 à 400 mesh) en cycle Cl^- (8 $\times$ 1 cm). L'élution est effectuée selon Maitra et Hurwitz [4] avec les solutions suivantes, à raison de 100 ml/h: S_1 : HCl 0,01 N, LiCl 0,05 M (élue le GMP); S_2 : HCl 0,01 N, LiCl 0,1 M (élue le GDP); S_3 : HCl 0,01 N, LiCl 0,2 M (élue le GTP); S_4 : HCl 0,05 N, LiCl 0,2 M (élue le guanosine tétraphosphate).

L'absorbance des fractions (10 ml) est mesurée à 260 m μ . Puis à chacune d'elles on ajoute 1,5 ml d'une suspension de Norite A à 3 g/100 ml d'eau. La Norite est recueillie sur un filtre Millipore (1,2 μ) qui est retourné sur une coupelle et compté avec un compteur à circulation gazeuse Nuclear-Chicago. Dans ces conditions, 70% de la radioactivité éluee de la colonne de Sephadex est retrouvée adsorbée sur le charbon.

RÉSULTATS

Mise en évidence d'un matériel retenu par filtration directe et soluble en milieu acide

Nous avons suivi l'apparition des chaînes de RNA par l'incorporation de [$\gamma^{32}\text{P}$]GTP en présence de DNA connus pour favoriser l'initiation des chaînes débutant par la guanosine. Le Tableau 1 montre qu'en présence des facteurs habituels de la synthèse du RNA, à l'exclusion de l'ATP, remplacé par son analogue 3'-dés-oxadénosine triphosphate (3'dATP), le [$\gamma^{32}\text{P}$]GTP est incorporé dans un matériel retenu sur Millipore



Tableau 1. *Caractéristiques du matériel retenu par filtration directe en présence de 3'dATP; comparaison avec du RNA témoin*
 Expérience I: Mélange standard d'incubation (0,5 ml): Tris pH 8 50 mM, $MgCl_2$ 5 mM, $MnCl_2$ 1 mM, β -mercaptoéthanol 8 mM, nucléosides triphosphates 20 μ M dont [3H]CTP (12.000 coups/min/nmole) et [$\gamma^{32}P$]GTP (2.000 coups/min/pmole). Pour le RNA témoin l'ATP (20 μ M) remplace le 3'dATP (2 μ M). DNA de thymus 50 nmole RNA polymérase 10 unités. D'autres éléments sont ajoutés en début ou en fin d'incubation aux concentrations indiquées dans le Tableau; désoxyribonucléase pancréatique 25 μ g; ribonucléase T_1 5 μ g + ribonucléase pancréatique 25 μ g. Après 60 min d'incubation à 37°, la réaction est arrêtée et les échantillons sont soumis à la filtration directe (voir Méthodes) sauf dans le cas (indiqué acide trichloroacétique à 50 g/l) où la méthode de précipitation en milieu acide est employée

Expérience II: Comme l'expérience I sauf DNA de phage T_7 2 μ g, 3'dATP 9 μ M, [$\gamma^{32}P$]GTP (1.500 coups/min/pmole)

Additions	Radioactivité			
	Avec ATP		Avec 3'dATP	
	3H	^{32}P	3H	^{32}P
	coups/min		coups/min	
Système complet (thymus)	12.560	5.360	182	2.165
Acide trichloroacétique (50 g/l)	13.480	5.675	70	315
$t = 0$ contrôle	20	150	20	165
Sans DNA	24	380	20	290
Sans Mg^{++} ni Mn^{++}	350	400	30	320
Sans enzyme	20	150	20	170
KCl 0,6 M à $t = 0$	70	350	25	440
KCl 0,6 M à 1 h	12.790	5.280	153	1.620
Dodécylsulfate de sodium (4 g/l) à 1 h	160	690	25	190
DNA dénaturé	5.590	10.400	156	2.620
Désoxyribonucléase à $t = 0$	70	340	60	570
Ribonucléases à $t = 0$	1.460	1.670	150	2.075
Système complet (T_7)	5.450	2.200	100	900
Ribonucléases à $t = 0$	360	500	106	920

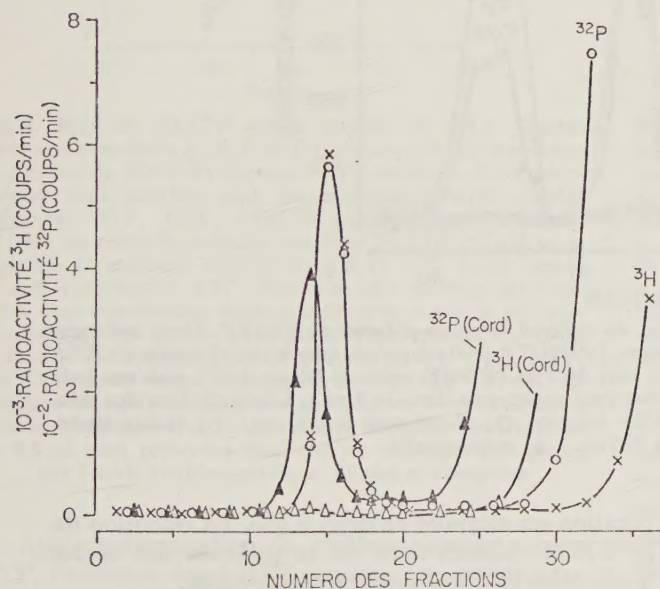


Fig. 1. Filtration sur Sephadex G-75. Deux mélanges standards (voir expérience II, Tableau 1) contenant 13 μ g de DNA de T_7 , [3H]CTP, [$\gamma^{32}P$]GTP (1.150 coups/min/pmole) et 10 unités de RNA polymérase sont incubés en présence soit d'ATP (RNA témoin) soit de 3'dATP, pendant 45 min à 37°, puis filtrés sur Sephadex (voir Méthodes). Les résultats obtenus sont superposés dans la figure. RNA témoin: $\times$, 3H ; $\circ$, ^{32}P ; 3'dATP: Δ , 3H ; $\blacktriangle$, ^{32}P

par filtration directe et soluble dans l'acide trichloroacétique à 50 g/l. Ce matériel est également marqué par le tritium, provenant du CTP. Cette incorporation

dépend de la présence du DNA, de l'enzyme et des ions divalents. Elle est supprimée si du KCl (concentration finale 0,6 M) est ajouté en début d'incubation. L'addition de KCl en fin d'incubation toutefois a peu d'effet. Le dodécylsulfate de sodium à 4 g/l rend la radioactivité filtrable. On retrouve un comportement analogue avec le RNA synthétisé en présence des quatre triphosphonucléosides habituels (RNA témoin). Cependant, le matériel marqué au 3H et au ^{32}P incorporé en présence de 3'dATP a deux particularités essentielles: il est soluble dans l'acide trichloroacétique à 50 g/l et parfaitement résistant aux ribonucléases. La solubilité dans l'acide est un critère que nous avons choisi pour définir les oligonucléotides naissants. Ce matériel peut être isolé également par filtration sur Sephadex G-75 (Fig. 1). On constate qu'il est associé à une structure de poids moléculaire élevé puisqu'il est élué avec le volume mort de la colonne.

Nature du matériel formé en présence de 3'dATP

Incorporation du $\gamma^{32}P$ GTP à l'extrémité de chaînes de RNA. Le matériel retenu sur Millipore étant soluble dans l'acide trichloroacétique à 50 g/l et insensible aux ribonucléases T_1 et pancréatique, on doit se demander s'il représente une courte chaîne de RNA ou bien du [$\gamma^{32}P$]GTP lié seul au complexe enzyme-DNA, ou à l'enzyme. Ces questions se posent aussi du fait des résultats de Stead et Jones [9]. En effet, ces auteurs ont montré que le GTP protège la RNA polymérase de la dégradation par la chaleur,

Tableau 2. Incorporation de [$\gamma^{32}\text{P}$]GTP seul ou en présence d'autres nucléotides

Des mélanges standards (volumes 0,3 ml) contenant: DNA de thymus (42 nmole) ou poly d(A-T) (4 nmole) ou DNA de T₇ (2 μg), [^3H]CTP (12.000 coups/min/nmole), [$\gamma^{32}\text{P}$]GTP (1.250 coups/min/pmole). Les nucléosides triphosphates 20 μM (3'dATP 9 μM), RNA polymérase 10 unités, sont incubés 60 min à 37°. La réaction est stoppée et les mélanges filtrés directement ou après précipitation par l'acide trichloroacétique. La radioactivité retenue en absence de matrice (70 coups/min de ^{32}P et 20 coups/min de ^3H) a été soustraite

Matrice	Nucléoside triphosphate	Radioactivité			
		Filtration directe		Précipitation acide	
		^3H	^{32}P	^3H	^{32}P
		coups/min		coups/min	
poly d(A-T)	GTP	—	0	—	—
	3'dATP, CTP, UTP, GTP	—	70	—	—
DNA de T ₇	ATP, CTP, UTP, GTP	7.760	2.260	10.680	2.550
	3'dATP, CTP, UTP, GTP	118	1.100	68	30
	GTP	—	380	—	100
DNA de thymus	GTP	—	1.080	—	300

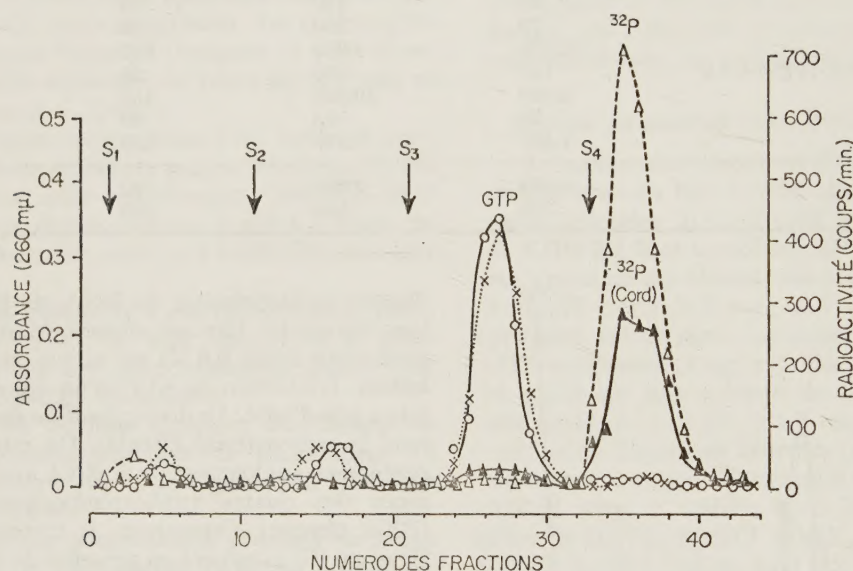


Fig. 2. Chromatographie sur Dowex 1 (Cl^-), après hydrolyse alcaline, du matériel formé en présence de 3'dATP. Deux mélanges standards (volumes 0,5 ml) contenant 61 nmole de DNA de thymus, [$\gamma^{32}\text{P}$]GTP (800 coups/min/pmole) et 75 unités de RNA polymérase sont incubés en présence soit d'ATP (RNA témoin) soit de 3'dATP 9 μM pendant 60 min à 37°, puis analysés comme il est décrit dans Méthodes. Les résultats des deux analyses sont superposés dans la figure. L'introduction des solutions employées pour l'éluion est indiquée par les flèches. RNA témoin: O, absorbance à 260 mμ; Δ, radioactivité. Cordécépine: x, absorbance à 260 mμ; ▲, radioactivité

et stabilise la liaison entre l'enzyme et le DNA du phage T₇.

La rétention du [$\gamma^{32}\text{P}$]GTP sur le Millipore n'est pas due à la RNA polymérase seule puisque, en l'absence de DNA, on ne recueille pas de matériel marqué au ^{32}P . La fixation de GTP par le complexe DNA-enzyme a été examinée dans les expériences suivantes (Tableau 2). En présence de poly d(A-T), très apte à lier l'enzyme [3], la rétention de GTP est nulle. Avec le DNA de thymus, le [$\gamma^{32}\text{P}$]GTP retenu sur le filtre est en partie précipitable par l'acide trichloroacétique. En présence de DNA de phage T₇, une petite quantité de [$\gamma^{32}\text{P}$]GTP est retenue. L'addition d'UTP, de CTP et de 3'dATP stimule cette incorporation environ 3 fois. Lorsque l'ATP remplace le 3'dATP, l'incor-

poration est stimulée environ 6 fois. La rétention du [$\gamma^{32}\text{P}$]GTP dépend donc de la présence des autres nucléotides et d'une matrice compétente.

L'incorporation du [$\gamma^{32}\text{P}$]GTP à l'extrémité de chaînes de RNA est mise directement en évidence dans l'expérience de la Fig. 2. Le matériel marqué au ^{32}P en présence de 3'dATP a été analysé après hydrolyse alcaline par chromatographie sur colonne de Dowex 1 (Cl^-). Pour obtenir du guanosine tétraphosphate [^{32}P]pppGp [4], on a soumis à la même analyse du RNA témoin synthétisé en présence de [$\gamma^{32}\text{P}$]GTP.

On constate que toute la radioactivité incorporée en présence de 3'dATP est éluée après le GTP entraîneur à la même place que le guanosine tétra-

phosphate. Ces données jointes au fait que du tritium provenant du CTP est toujours significativement associé au ^{32}P permettent de conclure à la présence de courtes chaînes de RNA initiées par le $[\gamma^{32}\text{P}]\text{GTP}$. Lorsque le $[\gamma^{32}\text{P}]\text{GTP}$ est le seul nucléotide, la rétention du ^{32}P observée pourrait refléter la formation de courtes chaînes de poly(G).

Incorporation de la cordycépine. Une série de préincubations ont été effectuées en présence et en absence de 3'dATP, suivies par l'addition d'un excès des 4 nucléosides triphosphates naturels (Fig. 3).

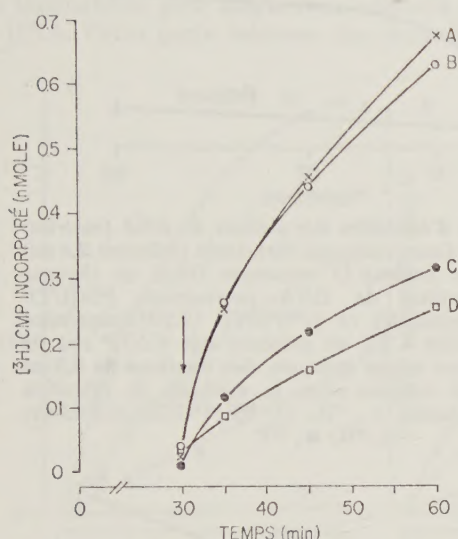


Fig. 3. Effet du 3'dATP sur la synthèse de RNA. Quatre mélanges standards A, B, C et D (volumes 0,5 ml) contenant 61 nmoles de DNA de thymus et 15 unités de RNA polymérase sont incubés avec les nucléosides triphosphates suivants: GTP, UTP, $[\gamma^3\text{H}]\text{CTP}$ (2.500 coups/min/nmole) 20 μM ; en outre le mélange contient 3'dATP 2,4 μM et le mélange D contient 3'dATP 2,4 μM et ATP 4 μM . Après 30 min d'incubation à 37° (flèche) chaque mélange est dilué 4 fois avec une solution contenant tampon et sels du mélange standard et les quatre nucléosides triphosphates de façon à obtenir les concentrations finales suivantes: GTP, UTP, $[\gamma^3\text{H}]\text{CTP}$ (2.500 coups/min/nmole) 80 μM , ATP 180 μM . Le mélange B reçoit en plus une quantité de 3'dATP égale à celle des mélanges C et D. Aux temps indiqués, des fractions de 0,5 ml sont prélevées dans chaque mélange, précipitées par l'acide trichloroacétique, filtrées et comptées

Après préincubation du système complet moins ATP, l'addition des 4 NTP entraîne une rapide synthèse de RNA (Fig. 3 courbe A); cette synthèse est inchangée si le 3'dATP est ajoutée en même temps que les 4 NTP (rapport ATP/3'dATP = 300), (Fig. 3, courbe B); cependant l'addition du 3'dATP au cours de la préincubation entraîne une inhibition ultérieure de la synthèse de RNA de 55% (Fig. 3 courbe C). Les concentrations relatives finales de 3'dATP et d'ATP étant les mêmes que dans l'expérience précédente, on peut conclure que la cordycépine a été incorporée au cours de la préincubation, interdisant la prolongation d'un certain nombre de chaînes. La synthèse résiduelle

pourrait être due aux chaînes commençant par A, non initiées pendant la préincubation. Pour vérifier cette hypothèse, une préincubation a été effectuée en présence d'ATP et de 3'dATP (rapport ATP/3'dATP = 1,7). L'enzyme peut alors initier des chaînes supplémentaires commençant par A dans lesquelles s'incorpore la cordycépine. On note en effet une inhibition accrue de la synthèse de RNA (Fig. 3 courbe D). Il apparaît ainsi que le matériel synthétisé, soluble dans l'acide trichloroacétique à 50 g/l est constitué de chaînes de RNA initiées par le $[\gamma^{32}\text{P}]\text{GTP}$ et dont le dernier nucléotide est la cordycépine. On appellera ce RNA $[\gamma^{32}\text{P}]\text{RNA-3'dAdo}$. Nous avons

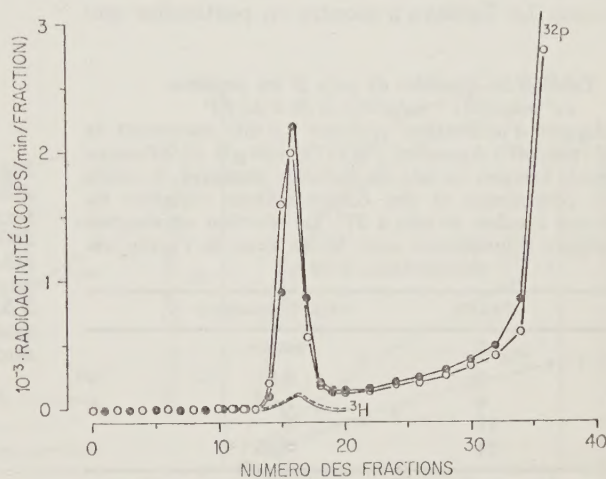


Fig. 4. Filtration sur Sephadex G-75 du $[\gamma^{32}\text{P}]\text{RNA-3'dAdo}$ formé en présence ou en absence de ribonucléases. Deux mélanges standards (volumes 0,3 ml) contenant 3 μg de DNA de T₇, $[\gamma^3\text{H}]\text{CTP}$ (17.000 coups/min/nmole), 14 unités de RNA polymérase sont incubés avec la 3'dATP 9 μM à la place de l'ATP. Les ribonucléases T₁ et pancréatique (5 et 25 μg respectivement) sont ajoutées à l'un des essais en début d'incubation. Après 60 min à 37° les mélanges sont filtrés sur Sephadex (voir Méthodes). Les résultats obtenus sont superposés sur la figure. RNA-3'dAdo: —, ^3H ; ●—●, ^{32}P ; RNA-3'dAdo + ribonucléases: ---, ^3H ; ○—○, ^{32}P

essayé d'estimer la longueur des oligonucléotides recueillis en multipliant par 3 (puisque la cordycépine est obligatoirement en position terminale) la quantité de $[\gamma^3\text{H}]\text{CTP}$ incorporée. On calcule ainsi des longueurs de chaînes de 10 à 40 nucléotides. Cependant ces valeurs doivent être considérées avec prudence.

Propriétés des chaînes de RNA synthétisées

Action des ribonucléases. L'insensibilité du $[\gamma^{32}\text{P}]\text{RNA-3'dAdo}$ à l'action conjuguée des ribonucléases T₁ et pancréatique déjà notée (Tableau 1) est confirmée par la filtration sur Sephadex G-75 (Fig. 4). La récupération du ^{32}P dans la fraction exclue du gel est la même, que l'incubation ait été faite en présence de ces ribonucléases ou non. De même, on a ajouté

25 μg de désoxyribonucléase pancréatique 15 min avant la fin de l'incubation qui dure 60 min sans modifier la quantité de ^{32}P recueilli dans la fraction exclue du gel. Cependant, mise en début d'incubation, la même quantité de désoxyribonucléase empêche la formation de ^{32}P RNA-3'dAdo (Tableau 1).

Stabilité. Les expériences du Tableau 1 montrent que le ^{32}P RNA-3'dAdo ne représente que 50 % du $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ incorporé dans le contrôle. De même par filtration sur Sephadex on ne retrouve par rapport au témoin que 60 % du ^{32}P (Fig. 1). A la suite de ces observations, on a recherché si la préparation de 3'dATP utilisée contenait un inhibiteur de la RNA polymérase. Le Tableau 3 montre en particulier que

Tableau 3. Synthèse de poly G en présence de poly(dG) · poly(dC) et de 3'dATP

Des mélanges d'incubation (volume 0,5 ml) contenant le poly(dG) · poly(dC) 5 nmoles, ^3H GTP 100 μM (2.200 coups min/nmole), tampon et sels du mélange standard, 8 unités de RNA polymérase et des concentrations variables de 3'dATP sont incubés 40 min à 37°. La réaction est stoppée et les milieux d'incubation sont filtrés avec de l'acide trichloracétique à 50 g/l

3'dATP	^3H GTP incorporé
μM	nmoles
0	0,9
4	1,05
12	1
24	0,95

la 3'dATP n'inhibe pas la synthèse de poly(G) en présence de poly(dG) · poly(dC) (voir également les expériences de la Fig. 3).

Il paraît ainsi peu probable qu'en présence de DNA de thymus ou de phage T_7 le 3'dATP inhibe l'initiation d'un certain nombre de chaînes commençant par G. La différence que l'on constate entre la quantité de ^{32}P RNA-3'dAdo recueillie et le nombre de chaînes commençant par la guanosine dans le témoin indique donc la perte d'un certain nombre de chaînes. L'existence d'une synthèse résiduelle de RNA dans les conditions de la courbe D (Fig. 3) suggère l'instabilité de certains complexes DNA-enzyme-RNA (par exemple le RNA formé est trop court). En effet une préincubation de 30 min aurait dû conduire à l'initiation de toutes les chaînes possibles et au blocage de leur prolongation par incorporation de cordycépine.

Cinétique d'initiation des chaînes de RNA. Les Fig. 5 et 6 montrent, en accord avec les résultats de Maitra [4], que dans des conditions normales de synthèse, 50 % des chaînes de RNA sont initiées dans les 5 premières minutes; l'initiation continue ensuite à un rythme plus lent pendant 30 à 60 min puis s'arrête. La synthèse de RNA total continue cependant entraînant une augmentation de la longueur moyenne des chaînes. Les Fig. 5 et 6 montrent aussi

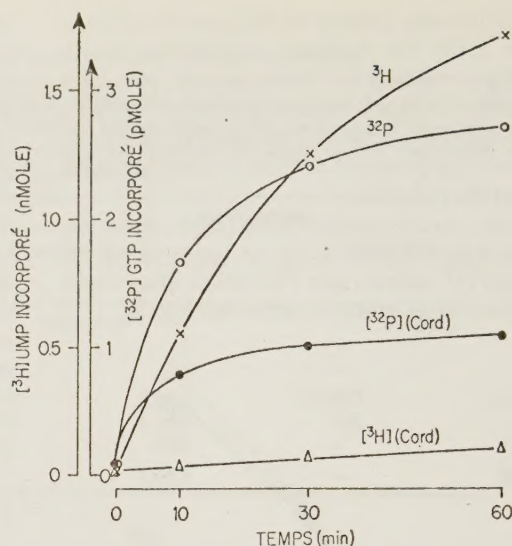


Fig. 5. Cinétique d'initiation des chaînes de RNA (matrice: DNA de thymus). Deux mélanges standards (volumes 2,5 ml) (expérience I du Tableau 1) contenant DNA de thymus 250 nmoles, 50 unités de RNA polymérase, ^3H UTP (12.000 coups/min/nmole) et $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ (2.200 coups/min/pmole) sont incubés à 37° en présence soit d'ATP soit de 3'dATP 2 μM . Aux temps indiqués, des fractions de 0,5 ml sont prélevées et traitées selon la méthode de filtration directe. RNA témoin: $\times$, ^3H ; $\circ$, ^{32}P ; ^{32}P RNA-3'dAdo: Δ , ^3H ; $\bullet$, ^{32}P

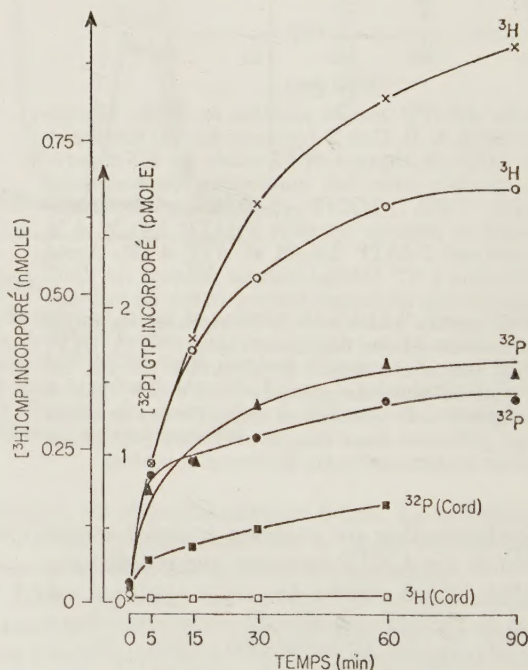


Fig. 6. Cinétique d'initiation des chaînes de RNA (matrice: DNA de T_7). Deux mélanges standards (volumes 2,5 ml) (expérience II du Tableau 1) contenant 17 μg de DNA de T_7 , 50 unités de RNA polymérase, ^3H CTP, $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ (1.150 coups/min/pmole), ATP ou 3'dATP, sont incubés à 37°. Aux temps indiqués, des fractions de 0,4 ml sont prélevées et filtrées directement ou après précipitation par l'acide trichloroacétique. RNA témoin: filtration directe $\circ$, ^3H ; $\bullet$, ^{32}P ; précipitation par l'acide trichloroacétique $\times$, ^3H ; Δ , ^{32}P ; ^{32}P RNA-3'dAdo (filtration directe): $\square$, ^3H ; $\blacksquare$, ^{32}P

que d'inhiber leur prolongation ne change pas la cinétique d'apparition des chaînes de RNA. Il apparaît ainsi que l'absence de synchronisation de l'initiation des chaînes est une propriété intrinsèque au phénomène d'initiation, et indépendante de l'allongement ultérieur.

Les cinétiques de la Fig. 6 soulignent une différence entre les deux méthodes de récupération du RNA témoin. Les résultats obtenus par filtration directe sont jusqu'à 15 min comparables à ceux résultant de la précipitation par l'acide trichloroacétique mais pour des incubations plus longues on constate une perte de RNA. Cette perte intéresse les chaînes de RNA

tité d'enzyme ajoutée jusqu'à un certain point au delà duquel la proportionnalité disparaît. Il n'a pas obtenu toutefois de saturation vraie par l'addition d'un excès d'enzyme. Nous avons suivi l'initiation des chaînes par l'incorporation de $[\gamma^{32}\text{P}]\text{GTP}$ à différentes concentrations relatives d'enzyme et de DNA. La Fig. 7A montre que pour les rapports de concentrations utilisés, l'initiation des chaînes croît comme la quantité de RNA formé. On remarque qu'en chaque point le nombre de $^{32}\text{P}]\text{RNA-3'dAdo}$ recueilli est proportionnel à la quantité d'enzyme ajoutée et représente environ la moitié des chaînes formées dans le témoin. Dans la Fig. 7B la quantité

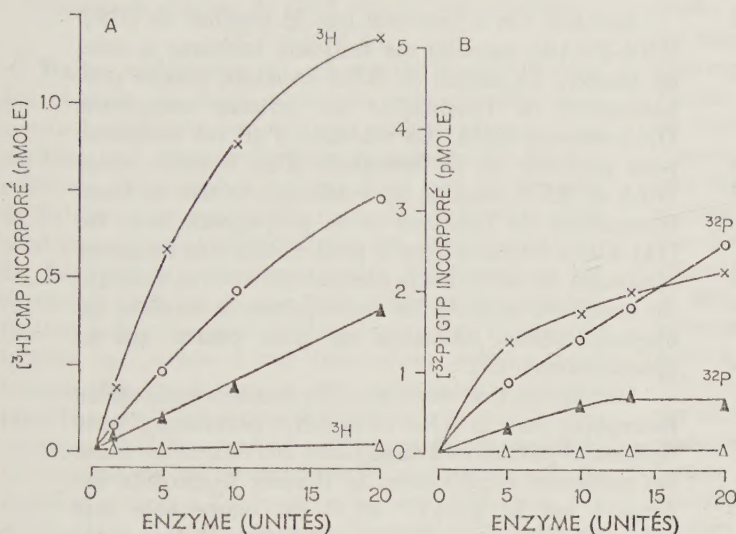


Fig. 7

Fig. 7. Influence de l'enzyme et du DNA sur l'initiation des chaînes de RNA. (A) Des mélanges standards (0,5 ml) contenant 2,7 μg de DNA de T_7 , $[\text{H}^3]\text{CTP}$ (12.000 coups/min/nmole), $[\gamma^{32}\text{P}]\text{GTP}$ (1.150 coups/min/pmole), ATP ou 3'dATP (9 μM) sont incubés 60 min à 37° avec des quantités variables de RNA polymérase. Le RNA témoin: $\times$, ^3H ; $\circ$, ^{32}P , est recueilli après précipitation par l'acide trichloroacétique; le $^{32}\text{P}]\text{RNA-3'dAdo}$: Δ , ^3H ; Δ , ^{32}P par filtration directe. (B): comme pour (A) mais avec 0,7 μg de DNA de T_7 .

Fig. 8. Influence de l'enzyme sur l'initiation et la synthèse de RNA. Des mélanges standards (volume 0,5 ml) contenant 0,7 μg de DNA de T_7 , $[\gamma^{32}\text{P}]\text{GTP}$ ou $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (850 coups/min/pmole) et $[\text{H}^3]\text{CTP}$ (9.500 coups/min/nmole) sont incubés 60 min à 37° avec des quantités variables de RNA polymérase et filtrés après précipitation par l'acide trichloroacétique. $\circ$, $[\text{H}^3]\text{CTP}$ incorporé dans les mélanges contenant $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$; Δ , $[\text{H}^3]\text{CTP}$ incorporé dans les mélanges contenant $[\gamma^{32}\text{P}]\text{GTP}$; Δ , $[\gamma^{32}\text{P}]\text{GTP}$; $\bullet$, $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$.

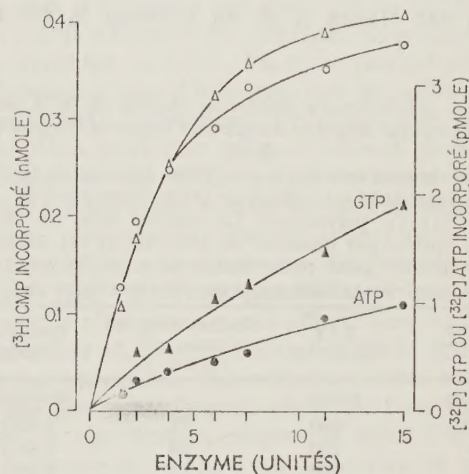


Fig. 8

les plus longues puisque la récupération du ^{32}P est peu affectée. Cela peut être dû à l'extrême fragilité des chaînes de RNA synthétisées sur le DNA de T_7 du fait de leur grande longueur. On est arrivé à la même conclusion en analysant le RNA synthétisé à différents temps sur le DNA de T_7 par chromatographie sur colonne de sérumalbumine méthylée [10]. Jusqu'à 60 min d'incubation une telle différence est peu visible dans les essais que nous avons menés avec le DNA de thymus.

Etude du nombre de chaînes de RNA synthétisées sur le DNA de T_7

Richardson a montré [11] que la quantité de RNA synthétisé en 10 min est proportionnelle à la quan-

de DNA de T_7 a été divisée par 4. Dans ces conditions l'addition de quantités croissantes d'enzyme n'entraîne qu'une faible augmentation du RNA témoin formé alors que le nombre de chaînes continue à croître. Il est remarquable au contraire qu'en présence de 3'dATP le nombre de chaînes initiées tend vers un maximum indiquant la saturation des sites d'initiation correspondants.

Dans une expérience analogue à celle de la Fig. 7B, nous avons suivi indépendamment l'initiation des chaînes commençant par la guanosine et par l'adénosine ainsi que la synthèse de RNA (Fig. 8). On voit que les deux familles de chaînes augmentent linéairement avec la quantité d'enzyme ajoutée, alors que la synthèse de RNA tend rapidement vers un maxi-

mun. Le GTP est le nucléotide initial le plus fréquent. Les chaînes initiées par l'adénosine représentent la moitié environ de celles commencées par la guanosine.

A partir des données de la Fig. 8 nous avons calculé, dans le Tableau 4, le nombre de chaînes initiées par T_7 et leur longueur moyenne. Ce nombre de chaînes dès l'instant où la synthèse de RNA n'est plus proportionnelle à la quantité d'enzyme, est de l'ordre de 48. Mais on constate que cette valeur double en présence d'un excès d'enzyme. En outre la longueur moyenne des chaînes diminue avec l'augmentation du rapport enzyme/DNA. Cette diminution est particulièrement forte pour les rapports enzyme/DNA élevés. Des observations semblables ont été rapportées par Maitra *et al.* en utilisant le DNA de T_4 [12].

Tableau 4. Evolution du nombre de chaînes de RNA initiées et de leur longueur moyenne à différents rapports Enzyme/DNA de T_7 .

Les résultats sont calculés à partir des données de la Fig. 8. Le RNA synthétisé est obtenu en multipliant par 4 la quantité de [3H]CTP polymérisé. Le nombre total de chaînes (A + G) initiées par molécule de DNA de T_7 est calculé en prenant 26×10^9 pour poids moléculaire du DNA [13]. La RNA polymérase utilisée a une activité spécifique de 3.000

Enzyme DNA	RNA synthétisé	Nombre de chaînes initiées par DNA de T_7	Longueur moyenne
en poids	pmoles		nucléotides
0,75	480	11	1.600
1,1	720	19	1.400
1,9	970	31	1.200
3	1.200	48	930
3,75	1.350	62	850
5,5	1.450	87	630
7,5	1.500	108	530

DISCUSSION

Formation d'oligonucléotides naissants en présence de 3'dATP

Le matériel marqué retenu sur Millipore et soluble dans l'acide trichloroacétique à 50 g/l correspond à des oligonucléotides naissants. En effet:

a) L'omission de l'un quelconque des facteurs nécessaires à la synthèse de RNA supprime l'incorporation de ^{32}P ;

b) Après hydrolyse alcaline la radioactivité se comporte comme du guanosine tétraphosphate [^{32}P]pppGp ce qui indique qu'il s'agit bien de la synthèse d'une courte chaîne de RNA et non de la rétention du [γ - ^{32}P]GTP seul.

c) L'association de ce RNA avec le complexe DNA-enzyme a été mise à profit pour l'isoler: la filtration sur Sephadex montre en effet qu'il est associé à une structure de haut poids moléculaire¹.

¹ Après filtration sur Sephadex les fractions contenant le ^{32}P (RNA témoin) synthétisent du RNA par simple addition des 4 nucléosides triphosphates.

Comme le complexe DNA-enzyme [3], il est retenu sur Millipore. La dissociation du complexe DNA-enzyme-RNA par le dodécylsulfate de sodium à 4 g/l [2, 11], rend le RNA filtrable. Enfin le KCl 0,6 M qui est sans effet sur le complexe ternaire [13] n'empêche pas non plus sa rétention sur Millipore. Par ailleurs il a été vérifié que du RNA témoin isolé par chromatographie sur colonne de sérumbumine méthylée n'est pas retenu dans ces conditions.

Caractéristiques du complexe ternaire DNA-RNA polymérase-oligonucléotide naissant

Stabilité. On a constaté que le nombre de [^{32}P]-RNA-3'dAdo recueilli est toujours inférieur à celui du témoin. Le déficit de RNA constaté résulte probablement de l'instabilité de certains complexes DNA-enzyme-RNA. La stabilité d'un tel complexe peut provenir de la formation d'un hybride entre DNA et RNA, localisé au voisinage du site de fonctionnement de l'enzyme et se propageant avec lui [14]. Dans ces conditions il peut exister une longueur minimum de cet hybride compatible avec la stabilité du complexe ternaire. En conséquence ce seraient les oligonucléotides naissants les plus courts qui se détacheraient [15].

Une interaction entre le ou les derniers nucléotides incorporés dans le RNA et la RNA polymérase peut également participer à la stabilité de l'ensemble. Dans les présentes expériences, le dernier nucléotide incorporé est le 3'dATP et il est concevable que cet analogue de l'ATP modifie cette interaction. Toutefois l'omission simultanée d'ATP et de 3'dATP ne permet pas de retrouver le nombre de chaînes initiées par GTP dans le contrôle. Il paraît ainsi très probable que c'est bien la petitesse de certaines chaînes de RNA qui est responsable de la perte constatée.

Il est intéressant de constater que l'arrêt de la progression de la RNA polymérase par la cordécépine n'entraîne pas le détachement, et donc la perte par filtration directe, de toutes les chaînes de RNA. Il doit donc exister un mécanisme spécifique qui fait coïncider le détachement du RNA du complexe ternaire avec la fin normale de la transcription.

Résistance aux ribonucléases. La résistance aux ribonucléases est sans doute une conséquence de la faible longueur de ces chaînes. Les oligonucléotides peuvent être engagés dans un hybride avec le DNA ainsi que nous le proposons plus haut mais il est également possible que l'encombrement de la RNA polymérase les rende inaccessibles à toute autre protéine. Il est remarquable que même dans les contrôles une partie notable du matériel marqué au ^{32}P est résistante aux ribonucléases introduites dès le début de l'incubation. S'il est possible d'imaginer la formation d'un hybride au niveau des parties dénaturées du DNA de thymus qui peuvent représenter des sites

d'initiation préférentiels [16] ce n'est probablement pas le cas avec le DNA du phage T₇ [13]. On ne discutera pas davantage ces observations soulignant que les ribonucléases peuvent interférer avec le fonctionnement de la RNA polymérase [17, 18]. L'oligonucléotide naissant étant protégé de l'attaque des ribonucléases, on peut concevoir qu'une partie de la matrice soit soustraite à l'action de la désoxyribonucléase pancréatique. Cela expliquerait pourquoi l'oligonucléotide naissant reste attaché à une structure exclue du Sephadex G-75 en présence de désoxyribonucléase.

Nombre de chaînes de RNA initiées par molécule de DNA de T₇

Maitra et Hurwitz [4] ont montré que l'initiation des chaînes de RNA n'est pas instantanée. Nous avons montré que ceci est vrai également pour l'apparition des oligonucléotides naissants. Le phénomène de polymérisation n'est donc pas responsable de l'absence de synchronisation de l'initiation. Ceci peut provenir de l'hétérogénéité des sites d'initiation, du fait que le complexe binaire DNA-enzyme est réversible [3, 8, 13] et que nous utilisons une concentration faible en substrat [19]. Le nombre de chaînes initiées au cours d'une incubation suffisamment longue par des quantités non saturantes d'enzyme (synthèse de RNA proportionnelle à la quantité d'enzyme) est inférieur ou égal à 50 par molécule de DNA. Ce résultat est en accord avec le nombre de sites de fixation estimés à l'aide de techniques différentes par Richardson [13] et Jones et Berg [3]. En présence d'un excès d'enzyme, nous constatons toutefois l'apparition de chaînes nouvelles (Fig. 7B et 8). Or Richardson a décelé en l'absence de synthèse de RNA, une interaction faible, non spécifique entre l'enzyme en excès et le DNA de T₇. Récemment Pettitjohn et Kamiya [20] ont montré une fixation non spécifique à basse force ionique de la RNA polymérase sur le DNA de polyoma. Ces observations faites en absence de synthèse de RNA ne semblent pas être liées à l'initiation observée dans les Fig. 7B et 8. En effet, les molécules de RNA polymérase fixées non spécifiquement sont détachées du DNA par le KCl 0,5 M en présence des triphosphonucléotides, ce qui laisse supposer qu'elles ne sont pas fonctionnelles [20]. Ajoutons qu'on n'a pas décelé par filtration directe une initiation plus importante que celle obtenue par précipitation.

L'accroissement du nombre de chaînes initiées en présence d'un excès d'enzyme peut s'expliquer si au cours de la synthèse, les sites d'initiation existants sont utilisés plusieurs fois. On pourrait penser aussi que la RNA polymérase par son fonctionnement crée des sites d'initiation nouveaux accessibles à l'enzyme non encore fixé. Cette hypothèse est peu probable, car dans l'expérience de la Fig. 7B le nombre d'oligonucléotides naissants ([³²P]RNA-3'dAdo) tend vers un

maximum, comme le RNA témoin, soulignant l'existence d'un nombre fini de sites d'initiation. Comme les oligonucléotides sont très courts, le déplacement de la RNA polymérase sur le DNA est limité. On peut alors concevoir que le site d'initiation utilisé demeure inaccessible par suite de la présence de l'enzyme dont la migration est arrêtée. La réutilisation des sites par d'autres molécules d'enzyme est de ce fait interdite, ce qui explique le plateau de saturation obtenu. Ainsi, au cours du fonctionnement normal de la RNA polymérase, il est peu probable que des sites d'initiation nouveaux soient créés, mais au contraire que les sites originaux sont susceptibles d'être utilisés plusieurs fois. On peut se demander si du nombre de chaînes initiées, on peut calculer le nombre de sites d'initiation par molécule de DNA. Richardson [11] fait l'hypothèse que l'infléchissement du taux de synthèse de RNA (Fig. 8) se produit au moment où tous les sites d'initiation ont été utilisés une fois par la RNA polymérase. Or, d'une part, la synthèse de RNA peut être progressivement gênée par l'accumulation des RNA polymérases sur la matrice et par le RNA formé, comme semble l'indiquer le fait qu'une plus grande quantité d'enzyme est nécessaire pour obtenir le maximum d'oligonucléotides naissants (Fig. 7B). Il est possible aussi que la RNA polymérase n'ait pas la même affinité pour tous les sites potentiels et, comme l'initiation de la synthèse n'est pas synchrone, que certains d'entre eux soient utilisés préférentiellement plusieurs fois. En conséquence, la signification exacte du point d'inflexion de la courbe de la Fig. 8 est mal connu, et le nombre de sites d'initiation par molécule de DNA est une approximation. La détermination du nombre de sites d'initiation par la mesure du nombre d'oligonucléotides naissants obtenus en présence de cordycépine pourrait être une méthode idéale si l'on était capable de déterminer à la fois le nombre d'oligonucléotides naissants commençant par GTP et par ATP. En outre il faudrait être sûr de la signification de la différence constatée dans la récupération des chaînes synthétisées en absence et en présence de cordycépine. C'est pourquoi si l'emploi de la cordycépine triphosphate permet, en particulier, de montrer que le nombre de sites d'initiation pour la synthèse de RNA est limité, il est prématuré d'utiliser ce nombre de chaînes pour un dénombrement exact des sites d'initiation par molécule de DNA. On note enfin dans le Tableau 4 que la longueur moyenne des chaînes de RNA décroît quand leur nombre passe de 10 à 100 par molécule de DNA. Parmi les causes possibles de la diminution de la longueur du RNA, on évoquera l'encombrement du DNA par les molécules de RNA polymérase, ainsi que les perturbations provoquées par le RNA déjà synthétisé. On rappellera que la synthèse de RNA est favorisée par les ribonucléases [17, 18], ainsi que par son couplage avec la traduction [21].

Nous remercions E. J. Simon des longues discussions que nous avons eues au cours de son année sabbatique parmi nous. Nous remercions également F. Gros, F. Chapelville et M. Revel de leurs conseils et encouragements.

BIBLIOGRAPHIE

1. Sentenac, A., Simon, E., et Fromageot, P., *Biochim. Biophys. Acta*, 161 (1968) 299.
2. Bremer, H., et Konrad, M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* 51 (1964) 801.
3. Jones, O. W., et Berg, P., *J. Mol. Biol.* 22 (1966) 199.
4. Maitra, U., et Hurwitz, J., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* 54 (1965) 815.
5. Shigeura, T., et Boxer, G. E., *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 17 (1964) 758.
6. Tener, G. M., *J. Am. Chem. Soc.* 83 (1961) 159.
7. Smith, M., et Khorana, H. G., *J. Am. Chem. Soc.* 80 (1958) 1141.
8. Chamberlin, M., et Berg, P., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* 48 (1962) 81.
9. Stead, N. W., et Jones, O. W., *Biochim. Biophys. Acta*, 145 (1967) 679.
10. Darlix, J. L., Sentenac, A., et Fromageot, P., Manuscrit en préparation.
11. Richardson, J. P., *J. Mol. Biol.* 21 (1966) 115.
12. Maitra, U., Nakata, Y., et Hurwitz, J., *J. Biol. Chem.* 242 (1967) 4908.
13. Richardson, J. P., *J. Mol. Biol.* 21 (1966) 83.
14. Hayashi, M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* 54 (1965) 1736.
15. Michelson, A. M., and Monny, C., *Biochim. Biophys. Acta*, 149 (1967) 107.
16. Berg, P., Kornberg, R. D., Fancher, H., et Dieckmann, M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 18 (1965) 932.
17. Krakow, J. S., *J. Biol. Chem.* 241 (1966) 1830.
18. Maitra, U., et Hurwitz, J., *J. Biol. Chem.* 242 (1967) 4897.
19. Anthony, D. D., Zeszotek, E., et Goldthwait, D. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* 56 (1966) 1026.
20. Pettitjohn, D., et Kamiya, T., *J. Mol. Biol.* 29 (1967) 275.
21. Revel, M., et Gros, F., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 27 (1967) 12.

A. Sentenac, A. Ruet et P. Fromageot
Service de Biochimie, Département de Biologie
Centre d'Etudes Nucléaires de Saclay
F-91 Gif-sur-Yvette, France

